ORSAY
Série A. N°
Enregistré sous le n° 259

Paris

ETUDE DE QUELQUES ACTIONS PERIPHERIQUES DE VENINS DE SERPENTS.

ARTICLES PRINCIPAUX

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, enregistrée au C.N. R.S sous le n° A.O. 1541.

de Mme ARVEILLER ép. ROCH Monique, Marie

soutenue le 16 Juin 1967 à la FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY.

devant le jury :

MM.	COUTEAU	Président.
	CORABOEUF	Examinateurs.
Mle.	BEAUVALLET	
M.	CHEYMOL	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Toxicon, 1967, Vol. 5. pp. 111–119. Pergamon Press Ltd., Printed in Great Britain

UNIV. LEIDEN BIBL.

ACTION NEUROMUSCULAIRE DE TROIS VENINS D'HYDROPHIIDÉS*

J. CHEYMOL, M. BARME, F. BOURILLET et M. ROCH-ARVEILLER
Institut de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Paris, France

(*Accepted for publication* 27 *April* 1967)

Résumé—Les auteurs ont étudié les effets paralysants de trois venins de serpents marins, *Enhydrina schistosa*, *Hydrophis cyanocinctus* et *Lapemis hardwickii*, Hydrophiidés du Viet Nam.

Ces actions paralysantes sont très voisines et présentent les caractéristiques suivantes:
la paralysie se produit à la périphérie,
la fibre musculaire n'est pas directement paralysée,
la fibre nerveuse ne semble pas atteinte,
les récepteurs spécifiques de la membrane post-synaptique, sont bloqués de façon pratiquement irréversible.

Cette paralysie est comparée à celle produite par la *d*-tubocurarine et par les venins de *Naja*.

Abstract—The authors studied the neuromuscular blocking action of three sea snake venoms, *Enhydrina schistosa*, *Hydrophis cyanocinctus* and *Lapemis hardwickii* from Viet Nam.

These actions were very similar and possessed the following characteristics:
the paralysis was a peripheral one,
muscular fibres were not directly blocked,
nerve fibres did not seem affected,
Specific receptors of the post-synaptic membrane were blocked almost irreversibly.

This paralysis was compared to that produced by curare and *Naja* venoms.

INTRODUCTION

Les Hydrophiidés, ou serpents marins, nombreux dans les eaux côtières des océans Indien et Pacifique [30, 1], provoquent par leurs morsures des intoxications comparées depuis longtemps (ROGERS [2, 31]) à celles causées par le curare ou les venins de cobras. Nous avons, dans le présent travail, cherché à préciser le mécanisme d'action de trois venins de serpents marins du Viet Nam (*Lapemis hardwickii*, *Enhydrina schistosa*, *Hydrophis cyanocinctus*) au niveau de la jonction neuromusculaire.

I. SUBSTANCES UTILISÉES ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

1. *Venins*

Serpents collectés par l'un d'entre nous (M.B.) sur les côtes du Viet Nam.

Les échantillons des différents venins ont été déshydratés à température ambiante et conservés à l'état sec sans précautions particulières. Les solutions faites dans l'eau distillée, sont gardées, cinq jours au plus, à + 4°.

*Partie d'un travail faisant l'objet d'une thèse de Doctorat d'Etat de la Faculté des Sciences d'Orsay, enregistrée sous le No. 259 en 1967.

2. *Toxicités*

Déterminées sur lots de 10 souris Swiss de 18 à 22 g. Injections i.v. de 0,3 ml en 20 sec. Calculs selon la méthode de KÄRBER et BEHRENS [3].

3. *Préparations neuromusculaires* in situ

Rat. Anesthésie: injection i.p. d'un mélange d'uréthanne (40 mg/100 g) et de mébubarbital (3 mg/100 g). Respiration artificielle. Enregistrement des contractions du tibial antérieur: stimulation indirecte par le nerf sciatique (0,1 c/sec—0,1 à 0,2 msec—3 à 5 V) stimulation directe par des électrodes piquées dans les fibres musculaires (0,1 c/sec—0,1 à 0,5 msec—50 à 80 V). Injections dans la veine jugulaire.

Dénervation chronique par ressection du nerf péronéal 8 à 10 jours avant expérience.

Chat. Anesthésie: injection i.p. ou i.v. d'un mélange de chloralose (80 mg/kg) et de mébubarbital (15 mg/kg).

Même préparation que pour le Rat, mais en plus des contractions du tibial antérieur, muscle blanc (stimulation indirecte 0,1 c/sec—0,2 à 0,4 msec—4 à 5 V); stimulation directe (0,1 c/sec—0,2 à 0,4 msec—50 à 80 V) peuvent être enregistrées celles d'un muscle rouge, le soléaire (stimulation indirecte seulement).

Pour les injections proches d'acétylcholine dans le muscle tibial antérieur (technique de BROWN [4]) un cathéter est placé à contre courant dans le bout périphérique de l'artère tibiale après avoir lié toutes les collatérales et enlevé le m. *extensor digitorum longus.* La stimulation du nerf sciatique est interrompue 2 min, pour permettre l'injection rapide d'ACh (2 à 10 μg en tout) répétée régulièrement toutes les 15 min. Injection des venins dans la veine jugulaire.

4. *Préparations isolées*

Diaphragme isolé de rat. Technique de BÜLBRING [5] modifiée par CHEYMOL *et coll.* [7, 29].

Bain de 50 ml de Tyrode (NaCl 8 g–KCl 0,2 g–$CaCl_2$ 0,2g–$MgCl_2$ 0,1 g–NaH_2PO_4 0,1 g–glucose 1 g–CO_3HNa 0,5 g p. 1000 ml) oxygéné par du carbogène. Stimulation indirecte par le nerf phrénique 0,1 c/sec—0,2 msec—5 à 6 V. Stimulation directe par deux électrodes négatives piquées dans le muscle, (une immergée à la base, l'autre émergée au sommet) et une électrode positive placée dans le bain: 0,1 c/sec—0,2 msec—50 à 80 V.

Diaphragme dénervé. Ressection du nerf phrénique 8 à 10 jours avant l'expérience. Technique de DALE et GADDUM [8] adaptée au Rat par VITAL BRAZIL [9]. Addition régulière d'ACh (0,5 à 1 μg/ml) toutes les 15 min: contact de 30 sec avec la préparation puis lavage continu pendant 9 min 30 sec. Stimulation pendant les 5 min précédant la nouvelle addition d'ACh.

Enregistrement de potentiels d'action du nerf et du muscle et du potentiel de plaque motrice. Par électrodes externes, stimulation du nerf phrénique 1 c/sec —0,05 à 0,1 msec— 2 à 3 V. Enregistrement simultané, sur un oscillographe à deux canaux du potentiel d'action du nerf et du potentiel d'action du muscle. Après suppression du potentiel musculaire, par action de 5×10^{-6} de *d*-tubocurarine pendant 5 à 8 min, enregistrement du potentiel de plaque. Bain de 20 ml de Tyrode. Aération par carbogène.

Rectus abdominis *isolé de grenouille.* Technique de GARCIA DE JALÒN [10].

Bain de 10 ml de Ringer oxygéné par de l'air comprimé. (NaCl 6,2 g–ClK 0,13 g–PO_4H_2Na 0,019 g–Cl_2Ca 0,11 g—CO_3HNa 0,3 g pour 1000 ml).

Coeur isolé de grenouille. Technique de Straub pour la Grenouille, et de Langendorff, adaptée au Rat.

II. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les venins de *Lapemis hardwickii*, d'*Enhydrina schistosa* et d'*Hydrophis cyanocinctus* ont une action neuromusculaire tout-à-fait comparable, nous permettant ainsi de les étudier ensemble. Nous avons pris le plus souvent pour exemple le venin de *Lapemis hardwickii*, dont nous possédions une plus grande quantité, mais toutes les expériences ont été reproduites et les résultats confirmés avec les venins d'*Enhydrina schistosa* et d'*Hydrophis cyanocinctus*. Nous soulignerons, chaque fois que cela sera nécessaire, les quelques différences d'activité que nous avons notées.

1. *Toxicités aiguës*

Les venins ont été administrés par voie veineuse, à des souris, après solubilisation extemporanée dans l'eau distillée.

Les calculs de DL_{50} ont donné les résultats suivants:

Echantillon de venin de *Lapemis hardwickii*	440 μg/kg
Echantillon de venin d'*Enhydrina schistosa*	350 μg/kg
Echantillon de venin d'*Hydrophis cyanocinctus*	665 μg/kg

Après une dose de 500 μg/kg de venin de *Lapemis*, les souris présentent, à la fin de l'injection, quelques secondes d'excitation. Aucun trouble n'est ensuite visible dans les 10 à 15 min suivantes. Puis la respiration s'accélère et devient saccadée. Les yeux sont exorbités; les membres se paralysent et la respiration apparaît de plus en plus difficile. Les animaux les plus touchés meurent en 30 min, les survivants retrouvent une respiration normale 5 h plus tard. Le rythme cardiaque est encore sensible quelques secondes après l'arrêt respiratoire et la mort semble due à une atteinte des muscles respiratoires plus qu'à une défaillance cardiaque.

Il y a souvent une légère hématurie après l'injection de fortes doses de venin d'*Hydrophis cyanocinctus*.

Ces observations confirment les symptômes cliniques décrits par REID [11 à 15] et CAREY and WRIGHT [16 et 17]: les venins de serpents marins exercent une action paralysante dont nous allons essayer de préciser le mécanisme.

2. *Analyse de l'action paralysante*

Ce phénomène est facile à montrer sur animaux entiers, anesthésiés, aussi bien que sur préparations isolées.

(a) *Description.* Une préparation neuromusculaire *in situ* se paralyse, tout comme une préparation isolée, de façon lente, irréversible, après un temps de latence d'autant plus long que la dose administrée est plus faible.

Nous retrouvons là tous les symptômes d'intoxication observés précédemment sur la Souris.

Sur une préparation nerf sciatique-tibial antérieur de Rat, la dose paralysante seuil se situe entre 75 et 100 μg/kg pour nos échantillons de venins de *Lapemis* et d'*Hydrophis* tandis qu'elle est comprise entre 50 et 75 μg/kg pour notre échantillon de venin d'*Enhydrina*.

La dose minimale active sur un diaphragme isolé de Rat est voisine de 1 μg/ml pour les trois échantillons. Deux μg/ml ajoutés au bain provoquent une paralysie qui apparaît après 20 et 30 min de contact et qui devient totale, malgré les lavages, 30 à 40 min plus tard.

La paralysie s'installant de la même façon et à doses comparables tant sur animal entier que sur préparations *in situ* ou isolée, apparaît donc comme ayant une origine périphérique.

(b) *Stimulation directe et indirecte.* Lors d'une stimulation directe et indirecte alternée des muscles, *in situ* ou isolés, l'amplitude des contractions obtenues par stimulation directe ne diminue pas alors que celle des contractions obtenues par stimulation indirecte diminue progressivement (Fig. 1).

(c) *Préparations dénervées.* On peut trouver confirmation de cette absence d'effets musculaires directs dans l'observation parallèle sur un même rat des contractions d'un tibial antérieur normal stimulé indirectement et celles du muscle symétrique, chroniquement dénervé, et stimulé directement. Les premières diminuent peu à peu d'amplitude sous l'effet des venins d'Hydrophiidés tandis que les secondes restent toujours égales à elles-mêmes (Fig. 2).

3. *Action de la* d-*tubocurarine et de ses antagonistes*

Les venins d'Hydrophiidés provoquent donc, après latence, une paralysie périphérique n'affectant pas directement les fibres musculaires et ressemblant à une curarisation. Pour préciser cette ressemblance nous avons étudié l'interaction de ces venins avec la *d*-tubocurarine.

Sur des préparations neuromusculaires *in situ* nous avons répété toutes les 30 min (3 fois) puis toutes les heures l'injection de doses inactives de *d*-tubocurarine (20 μg/kg i.v.) avec, ou sans, injections de doses non paralysantes de venins d'Hydrophiidés, 20 min après la première injection de curare. Les expériences témoins ont montré que l'on pouvait injecter 5, 6 ou 7, fois de suite 20 μg/kg de *d*-tubocurarine sans observer de paralysie, alors que, après venins d'Hydrophiidés, la deuxième injection de cette faible dose de *d*-tubocurarine est efficace. Ceux-ci sensibilisent donc la préparation à l'action paralysante de la *d*-tubocurarine: on remarque dans la Fig. 3 que cette action sensibilisante s'exerce, elle aussi, avec latence.

De même, après étalonnage d'un diaphragme de Rat isolé par des doses croissantes de *d*-tubocurarine et action d'une faible dose de venin (1 μg/ml) pendant 10 à 15 min, on peut observer une sensibilisation de la préparation à la *d*-tubocurarine dont les effets paralysants sont ainsi doublés ou triplés.

Il existe donc une synergie entre l'action des venins de serpents marins et celle de la *d*-tubocurarine.

Nous avons alors essayé d'inverser la paralysie produite par les venins d'Hydrophiidés par l'injection de quelques antagonistes classiques de la *d*-tubocurarine.

La néostigmine (250 μg/kg) injectée à une préparation neuromusculaire *in situ* de Rat ou 100 μg/ml ajoutés au bain de diaphragme et l'édrophonium (300 à 500 μg/kg ou 10 à 20 μg/ml) n'exercent qu'une action antagoniste transitoire vis-à-vis de la paralysie provoquée par les venins d'Hydrophiidés. Cet antagonisme fugace n'apparaît plus lorsque l'amplitude des contractions est réduite de plus de la moitié de sa valeur initiale (Fig. 4).

Les antagonistes du curare se révèlent donc peu efficaces vis-à-vis de l'action paralysante des venins d'Hydrophiidés.

4. *Analyse du mécanisme de l'action paralysante*

A. *Cette action est-elle présynaptique*? La nature périphérique, l'absence d'inhibition musculaire directe, la latence et le caractère progressif de l'effet paralysant pourraient faire penser que les venins d'Hydrophiidés agissent par un mécanisme voisin de celui de l'hemicholinium.

Nous savons que cette dernière substance inhibe le transport de la choline au lieu de

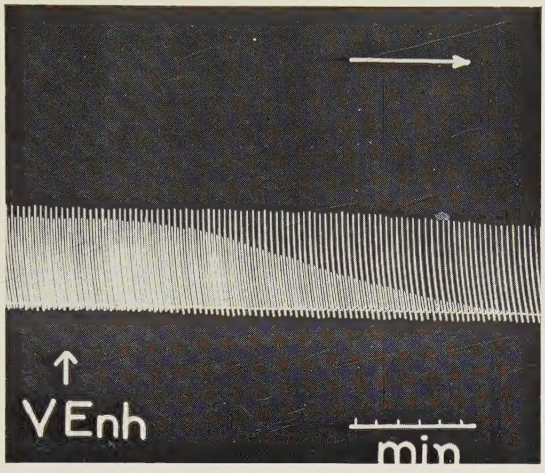

FIG. 1. STIMULATION DIRECTE ET INDIRECTE D'UN DIAPHRAGME ISOLÉ DE RAT.
à ↑ V. Enh. = 4 μg/ml de venin d'*Enhydrina schistosa*.

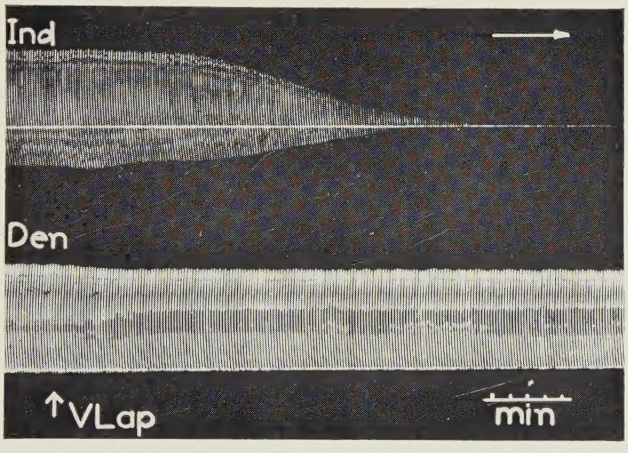

FIG. 2. ENREGISTREMENT SIMULTANÉ DES CONTRACTIONS DU TIBIAL ANTÉRIEUR DES PATTES DROITE ET GAUCHE D'UN RAT.

Ind. — stimulation indirecte du tibial antérieur, patte gauche.
Den. — stimulation directe du tibial antérieur, chroniquement dénervé, patte droite.
à ↑ V.Lap— 400 μg/kg de venin de *Lapemis*.

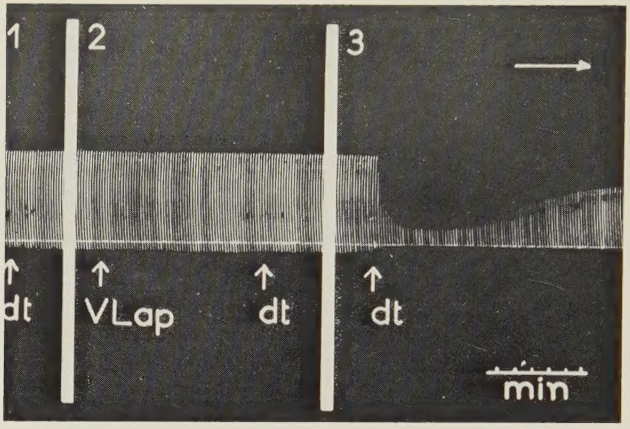

FIG. 3. SENSIBILISATION DE LA PRÉPARATION NEUROMUSCULAIRE *in situ* DE RAT À L'ACTION PARALYSANTE DE LA *d*-TUBOCURARINE SOUS L'INFLUENCE DU VENIN DE *Lapemis*.

1 à ↑ dt	20 μg/kg de *d*-tubocurarine	t = −20 min
2 à ↑ V.Lap.	90 μg/kg de venin de *Lapemis*	t = 0
à ↑ dt	20 μg/kg de *d*-tubocurarine	t = + 10 min
3 à ↑ dt	20 μg/kg de *d*-tubocurarine	t = + 40 min

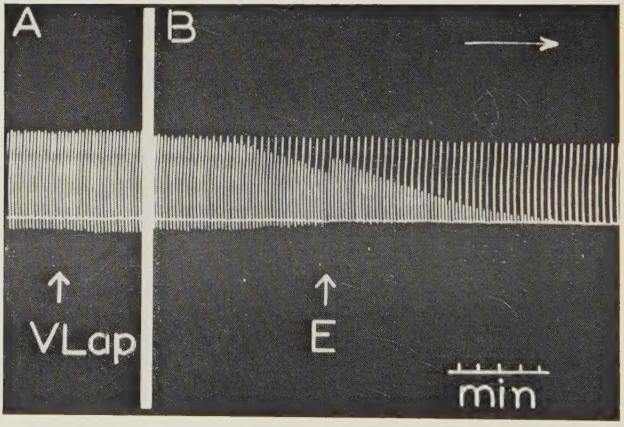

FIG. 4. STIMULATION DIRECTE ET INDIRECTE DU TIBIAL ANTÉRIEUR DE RAT.
à ↑ V.Lap. action de 200 μg/kg de venin de *Lapemis*.
à ↑ E 500 μg/kg édrophonium.

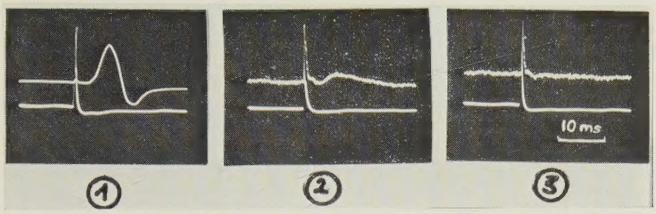

FIG. 5. SUPPRESSION DU POTENTIEL DE PLAQUE MOTRICE PAR VENIN D'HYDROPHIIDÉS. DIAPHRAGME ISOLÉ DE RAT.

Tracé supérieur	— potentiel d'action du muscle ou de plaque.
Tracé inférieur	— potentiel d'action du nerf.
En 1	— tracés témoins : potentiel d'action du muscle et du nerf.
Entre 1 et 2	— add. de *d*-tubocurarine (conc. finale 5×10^{-6}) pendant 7 min pour supprimer le potentiel d'action musculaire.
En 2	— amplification du tracé supérieur × 10. Potentiel de plaque et potentiel d'action du nerf.
Entre 2 et 3	— add. du venin d'*Hydrophis cyanocinctus* (conc. finale 5 × 10–6) au temps 0.
En 3	— au temps t + 25 min suppression complète et irréversible du potentiel de plaque motrice. Le potentiel d'action du nerf est inchangé.

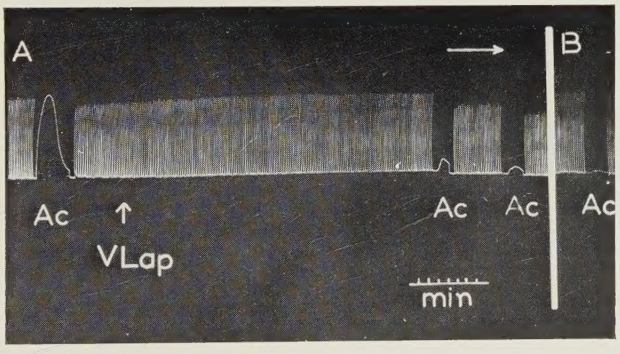

FIG. 6. DIAPHRAGME CHRONIQUEMENT DÉNERVÉ, ET ISOLÉ DE RAT.

A — Ac	—	0,5 μg/ml d'Ach sans stimulation électrique.
à ↑ V. Lap.	—	1 μg/ml de venin de *Lapemis* pendant 30 min puis action (Ac) de 0,5 μg/ml d'ACh sans lavage et après lavage.
B — Ac	—	0,5 μg/ml d'ACh 1 h après venin.

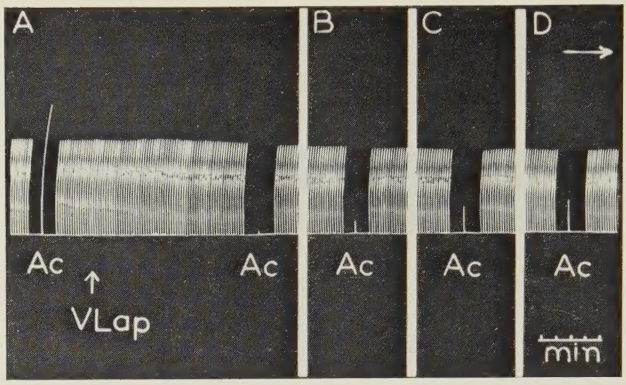

FIG. 7. CONTRACTIONS DU TIBIAL ANTÉRIEUR *in situ* DE CHAT PAR STIMULATIONS ÉLECTRIQUE OU CHIMIQUE.

Stimulation électrique du nerf sciatique : 0,1 c/sec—4 V—0,2 msec.
Stimulation chimique en Ac : injection intra-artérielle proche de 2,5 μg d'acétylcholine.
En A — au temps 0 (à ↑ V. Lap) : injection i.v. de 50 μg de venin de *Lapemis*, puis stimulation chimique au temps + 12 min, + 27 min (B), + 42 min (C) et + 57 min (D).

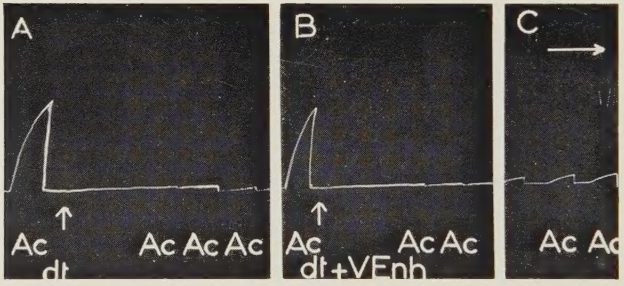

FIG. 8. *Rectus abdominis* ISOLÉ DE GRENOUILLE STIMULÉ EN Ac PAR 0,4 μg/ml D'ACÉTYLCHOLINE PENDANT 1 min.

A — Traitement préalable par une dose massive de *d*-tubocurarine. Ac: contracture témoin par acétylcholine.
Au temps 0 — ↑ dt: add. de *d*-tubocurarine (100 μg/ml pendant 20 min).
Au temps + 20 min, + 30 min, + 40 min.—Ac: Acétylcholine.
Entre A B: nombreux lavages de la préparation.
B — Traitement simultané par *d*-tubocurarine et par venin.
Au temps + 2 h 20 — Ac: acétylcholine.
Au temps + 2 h 25— ↑ dt + *V. Enh* : *d*-tubocurarine (100 μg/ml) + venin d'*Enhydrina* (0,5 μg/ml)
Au temps + 2 h 45, + 2 h 55—Ac: Acétylcholine.
Entre B et C: nombreux lavages de la préparation.
C—Réversibilité partielle de la paralysie.
Au temps + 3 h 25, + 3 h 35—Ac: Acétylcholine.
(Des expériences strictement identiques avec le venin seul, sans *d*-tubocurarine ont toujours conduit à un blocage total et absolument irréversible).

synthèse de l'acétylcholine et, de ce fait, empêche le renouvellement du stock de transmetteur. Il est possible de mettre en évidence un tel effet en favorisant l'épuisement des réserves d'ACh par augmentation de la fréquence de stimulation.

Pour cela, nous avons augmenté 10, puis 100 fois, la fréquence de stimulation du nerf sciatique ou du nerf phrénique. Pour des doses liminaires de venins aucune paralysie n'a été constatée après augmentation de fréquence. Pour de fortes doses, déjà paralysantes aux fréquences normales, la paralysie semble s'établir un peu plus rapidement lorsque la fréquence est augmentée, mais cette faible différence s'explique par la fatigue de la préparation.

Les venins d'Hydrophiidés ne semblent pas modifier le mécanisme de synthèse de l'ACh aux terminaisons nerveuses.

Afin de rechercher une éventuelle action présynaptique de ces venins, nous avons enregistré des potentiels d'action du nerf (Fig. 5). Nous n'avons pas observé de modification de ceux-ci au cours de l'empoisonnement des préparations par le venin.

B. *Action sur les récepteurs de la membrane post-synaptique.* Si rien ne semble indiquer une action des venins de serpents marins sur les structures ou les mécanismes présynaptiques, d'autres expériences confirment un effet inhibiteur au niveau des récepteurs de la plaque motrice:

(a) Les potentiels de plaque enregistrés après curarisation (5 μg/ml de *d*-tubocurarine ajoutés au bain pendant 5 à 8 min) diminuent progressivement quand on ajoute au bain 5 μg/ml de venin d'Hydrophiidés pour s'annuler en 20 à 30 min. Malgré les lavages abondants, et répétés, ces potentiels de plaque ne réapparaissent pas dans les 4 à 5 h qui suivent. L'action des venins est donc pratiquement irréversible.

Sur des préparations non curarisées, on observe une annulation progressive des potentiels d'action musculaire puis des potentiels de plaque, lorsque ces derniers peuvent être observés.

(b) De même, si l'on fait agir pendant 30 min une dose non paralysante de venin (0,5 à 1 μg/ml) sur un hémidiaphragme chroniquement dénervé et isolé devenu sensible à la stimulation chimique par l'acétylcholine, on constate que le venin annule, de façon irréversible, la contracture produite par l'ACh (Fig. 6).

Les venins d'Hydrophiidés semblent donc bloquer les récepteurs spécifiques de la plaque motrice, à des doses encore trop faibles pour produire une paralysie.

(c) Sur une préparation neuromusculaire de Chat *in situ*, l'injection artérielle proche d'ACh provoque normalement une contracture du muscle tibial antérieur; l'administration par voie veineuse de faibles doses de venin sub-paralysantes (50 à 75 μg/kg dans le cas du venin de *Lapemis*) supprime presque totalement la contracture acétylcholinique. Une réversibilité partielle est constatée dans la Fig. 7; mais avec de plus fortes doses l'effet est totalement irréversible.

Là encore, les récepteurs de la plaque sont bloqués par les venins d'Hydrophiidés.

(d) Ces venins, sans exercer d'action propre sur le *rectus abdominis* de Grenouille, même à doses très élevées (50 μg/ml) modifient les propriétés de la préparation en empêchant le muscle de se contracter sous l'influence de l'ACh.

Une dose de 0,25 μg/ml de venin de *Lapemis* appliquée à la préparation pendant 5 min diminue de moitié la contracture provoquée par une dose donnée d'ACh. Si l'on prolonge le temps de contact du venin avec la préparation, on obtient une suppression totale de l'effet contracturant de l'ACh. Cette action est irréversible.

Par contre, la contracture induite sur cette préparation par le chlorure de potassium n'est pas affectée par les venins d'Hydrophiidés, même à des doses de 50 μg/ml.

Les venins sont donc capables de bloquer les récepteurs spécifiques de l'acétylcholine de façon irréversible.

(e) Nous avons pu montrer (Fig. 8) sur le *rectus abdominis* de Grenouille une protection contre les venins de serpents marins par saturation préalable des récepteurs avec des doses massives de *d*-tubocurarine (Su [18]).

Dans un premier temps la préparation est laissée 20 min en contact avec 100 μg/ml de *d*-tubocurarine, puis lavée abondamment jusqu'à récupération totale de la sensibilité à l'ACh. Dans un second temps la préparation est soumise à l'action simultanée de 100 μg/ml de *d*-tubocurarine et de 0,5 μg/ml de venin d'*Enhydrina* pendant 30 min. Après lavages abondants et répétés, il est possible d'obtenir une réversibilité partielle de 20 à 25 pour cent de la contracture par l'acétylcholine.

Des expériences témoins identiques, mais sans addition de *d*-tubocurarine, montrent que le venin seul produit une paralysie totale et absolument irréversible, même après 3 h de lavage.

Il semble donc qu'une saturation préalable des récepteurs par la *d*-tubocurarine protège la préparation contre l'action paralysante des venins d'Hydrophiidés; ceci tend à prouver que la *d*-tubocurarine et la protéine active du venin agissent toutes les deux sur les mêmes récepteurs, ceux de la plaque motrice.

5. *Coeurs isolés de grenouille et de rat*

Les doses ou concentrations de venins de serpents marins correspondant approximativement à celles capables de paralyser les muscles volontaires, ne modifient, sur ces préparations, ni le rythme, ni l'amplitude des contractions cardiaques.

Par contre, à très fortes doses (5 à 10 fois les doses paralysantes), il est constaté tout d'abord une légère augmentation puis une lente diminution de l'amplitude des contractions conduisant le plus souvent à une arythmie et à l'arrêt cardiaque.

D'après ces expériences sur coeurs isolés, il apparaît donc que les effets cardiaques des venins d'Hydrophiidés interviennent dans les intoxications à un degré bien moindre que les effets neuromusculaires.

III. DISCUSSION

Les auteurs qui ont étudié les morsures provoquées par les serpents marins (Carey et Wright, [16, 17] et Reid [11–15]) s'accordent pour admettre avec l'un d'entre nous (Barme [19–21]) que leurs venins sont beaucoup plus toxiques que ceux des serpents terrestres.

Les DL_{50} que nous avons pu déterminer sur la Souris, avec les venins de *Lapemis hardwickii*, d'*Enhydrina schistosa* et d'*Hydrophis cyanocinctus* sont très voisines de celles d'autres venins de serpents terrestres (*Naja*, *Crotalus* .....) étudiés au laboratoire [22–23]. Toutefois, les chiffres que nous avons obtenus, ne peuvent être considérés comme représentatifs de chacune des espèces mais seulement d'un échantillon donné. Les variations individuelles de composition des venins, les procédés de récolte, de dessiccation, de conservation sont susceptibles de modifier grandement leur caractère toxique.

Les symptômes d'intoxication observés sur animaux entiers, anesthésiés ou non, avec mort par paralysie respiratoire, font penser à une curarisation. Reid [11, 13, 15] a décrit chez l'Homme une paralysie progressive avec ptose, trismus et douleurs musculaires dont la latence et la gravité variaient en fonction de la dose de venin inoculée et de la localisation de la morsure. Les malades qui se rétablissent ne présentent pas de séquelles.

Il apparaît donc que la paralysie produite par les venins d'Hydrophiidés s'établit chez toutes les espèces animales lentement, avec un certain délai, fonction de la dose reçue.

L'action paralysante s'exerce à un niveau périphérique. Nous n'avons pas recherché expérimentalement si une composante centrale pouvait intervenir; toutefois, ROGERS [2], FRASER et ELLIOT [24, 25] puis CAREY et WRIGHT [17] ont noté une action depressive centrale, non confirmée par les autres auteurs.

La paralysie ne provient pas d'une *action directe sur la fibre musculaire*: nos résultats sur muscles isolés ou *in situ*, normaux ou dénervés, concordent sur ce point. Pourtant, certains auteurs, d'après leurs observations après morsure, avaient émis l'hypothèse d'une altération de la fibre musculaire par les venins d'Hydrophiidés: MARSDEN et REID [26] ont constaté une myoglobinurie dans les cas graves et mortels, accompagnant des lésions tissulaires au niveau des muscles volontaires, des reins et du foie. Ces mêmes auteurs ont tenté de reproduire chez l'animal des lésions histologiques après injection de venin frais et ont retrouvé sur le Chien des myonécroses expérimentales intéressant un pourcentage très variable des fibres d'un muscle à l'autre. Par contre, l'un d'entre nous (M.B.) dans une étude antérieure [19], ayant prélevé les muscles aussitôt après la mort, n'a pu retrouver sur le Lapin, la moindre lésion histologique.

Nous n'avons, au cours de la présente étude, effectué aucun examen histologique systématique. Nous pouvons, toutefois, affirmer que les lésions de la fibre musculaire décrites par MARSDEN et REID [26] ne peuvent constituer la cause de la paralysie; peut-être, en sont elles une conséquence ou constituent-elles un phénomène parallèle ou tout-à-fait différent?

Au niveau des *structures nerveuses*, les venins de serpents marins ne semblent pas avoir d'action: pas de modification de la conduction nerveuse après immersion dans une solution de venin, pas d'effets sur les réserves de transmetteur au niveau des terminaisons.

Par contre, plusieurs types d'expériences tendent à prouver que l'action paralysante s'exerce au niveau des *récepteurs spécifiques de la membrane postsynaptique*:

annulation des potentiels de plaque motrice,

blocage des récepteurs du diaphragme dénervé de Rat, du tibial antérieur *in situ* de Chat, du *rectus abdominis* de Grenouille.

Sensibilisation de préparation isolée ou *in situ* à l'action paralysante de la *d*-tubocurarine par administration préalable de faibles doses de venins.

Empêchement d'une fixation irréversible des protéines actives du venin sur les récepteurs spécifiques par contact préalable avec de fortes concentrations de *d*-tubocurarine.

Il apparaît donc que l'action paralysante des venins d'Hydrophiidés s'effectue par blocage des récepteurs spécifiques de la plaque motrice, à la manière d'une classique curarisation. Toutefois, le caractère pratiquement irréversible de la paralysie entraînée par les venins de serpents marins ainsi que l'antagonisme faible et fugace qu'exercent la néostigmine et l'édrophonium, ne permettent pas d'envisager un mécanisme strictement identique à celui de la curarisation.

Dès sa première étude sur l'action physiologique de ces venins, ROGERS [2] a comparé leur action à celle des venins de cobra, déjà connue à l'époque; les symptômes sont, en effet, très parallèles, paralysie progressive apparaissant aprés une certaine latence.

Ayant étudié, par ailleurs, l'action paralysante de venins de divers *Naja* (*N. haje*, *N. naja*, *N. nigricollis* [6, 22, 23]), nous pouvons confirmer que le mécanisme de leur action est pratiquement identique à celui des venins d'Hydrophiidés. Les différences résident

principalement dans les phénomènes de contracture observés sur organes isolés et dans la dépression cardiovasculaire produite sur animaux entiers après injection de venins de *Naja*. Or, Lee *et coll.* [27] admettent que ces effets sont produits par une cardiotoxine, distincte de la neurotoxine responsable de l'effet paralysant. Les venins d'Hydrophiidés ne présentant d'effets dépresseurs cardiaques qu'à très fortes doses et ne provoquant pas de contracture sur organes isolés, il est vraisemblable qu'ils ne contiennent pas, ou pratiquement pas de cardiotoxine mais seulement une ou plusieurs neurotoxines.*

Sur le plan antigénique, l'un d'entre nous [19–21] a montré qu'une parenté assez étroite existait entre les trois venins d'*Hydrophis*, d'*Enhydrina* et de *Lapemis*, mais qu'il serait préférable d'envisager pour la thérapeutique l'emploi d'un sérum polyvalent. Par ailleurs, une certaine parenté antigénique a été montrée entre les venins d'Hydrophiidés et les venins de cobra; celle-ci est toutefois insuffisante et le traitement par le sérum anti-cobra des morsures par serpents marins s'est montré très peu efficace.

L'isolement et l'analyse des toxines de ces différents venins, l'étude de leurs propriétés antigéniques et la comparaison de leurs effets paralysants seront seuls capables de fournir une réponse précise à cette parenté d'action entre les venins de *Naja* et d'Hydrophiidés fort intéressante sur un plan biologique général.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Werler, J. E. et Keegan, H. L., Venomous snakes of the Pacific area. In: *Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region.* Oxford: Pergamon Press. p. 219, 1963.

[2] Rogers, L., On the physiological action of the poison of the *Hydrophiidae*. *Proc. R. Soc.* **71,** 481, 1903.

[3] Behrens, B. et Karber, G., Wie Sind Reihenversuche für biologische Auswertungen am zweckmassigsten Anzuordnen. *Arch. exp. Path. Pharmak.* **177,** 379, 1935.

[4] Brown, G. L., The preparation of the tibialis anterior (cat) for close arterial injections. *J. Physiol.* **92,** 22, 1938.

[5] Bülbring, E., Observations on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmac.* **1,** 38, 1946.

[6] Cheymol, J., Bourillet, F. et Roch-Arveiller, M., Venin de cobra (*Naja naja*) et paralysants neuromusculaires. *Med. Pharmac. exp.* **14,** 54, 1966.

[7] Cheymol, J. et Corteggiani, E., Etude critique des méthodes de standardisation des curares naturels et de synthèse. *Ann. Pharmac. Fr.* **7,** 368, 1949.

[8] Dale, H. H. et Gaddum, J. H., Reactions of denervated voluntary muscle and their bearing on the mode of action of parasympathetic and related nerves. *J. Physiol.* **70,** 109, 1930.

[9] Vital Brazil, O., Açao neuromuscular de peçonha de *Micrurus*. Thèse Sao Paulo, 1963.

[10] Garcia de Jalón, P. D., A simple biological assay of curare preparations. *Q. Jl Pharm. Pharmac.* **20,** 28, 1947.

[11] Reid, H. A., Sea snake bites. *Br. Med. J.* **2,** 73, 1956.

[12] Reid, H. A., Myoglobinuria and sea snake bite poisoning. *Br. Med. J.* **2,** 1284, 1961.

[13] Reid, H. A., Diagnosis, prognosis, and treatment of sea snake bites. *Lancet* **II,** 399, 1961.

[14] Reid, H. A., Snake bite in Malaya. In: *Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region.* Oxford: Pergamon Press, p. 355, 1963.

[15] Reid, H. A. et Lim, K. J., Sea snake bites. *Br. Med. J.* **2,** 1266, 1957.

[16] Carey, J. E. et Wright, E. A., The toxicity and immunological properties of some sea snake venoms with particular reference to that of *Enhydrina schistosa*. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* **54,** 50, 1960.

[17] Carey, J. E. et Wright, E. A., The site of the venom of the sea snake *Enhydrina schistosa*. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* **55,** 153, 1961.

[18] Su, C., Mode of curare-like action of cobra venom. *J. Formosan Med. Ass.* **59,** 19, 1960.

[19] Barme, M., Venomous sea snakes of Viet Nam and their venoms. In: *Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region.* Oxford: Pergamon Press. p. 373, 1963.

*Une récente publication de Tamiya et Arai [28] montre l'existence dans le venin d'un Hydrophiidé, *Laticauda semifasciata*, de deux neurotoxines les érabutoxines *a* et *b*. Leur composition en acides aminés très voisine serait également très proche de celle de la neurotoxine α du venin de cobra déterminée par le Pr. Porath (communication personnelle du Pr. Tamiya 1967).

[20] Barme, M. et Detrait, J., Etude de la composition des venins d'Hydrophiidés, *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* **248,** 312, 1959.
[21] Barme, M., Huard, M. et Nguyen Xuan Mai, Préparation d'un serum anti-venin d'Hydrophiidés. Premiers essais thérapeutiques. *Annls Inst. Pasteur* **102,** 497, 1962.
[22] Cheymol, J., Bourillet, F. et Roch-Arveiller, M., Actions neuromusculaires des venins de quelques Crotalidés, Elapidés et Hydrophiidés. *Simp. Int. Venenos Animais. Mem. Inst. Butantan.* Suppl. Commemorativo, **33,** 1966 (sous presse).
[23] Cheymol, J., Bourillet, F. et Roch-Arveiller, M., Actions neuromusculaires comparées de 3 venins de *Naja. Archs int. Pharmacodyn. Therapie* (sous presse).
[24] Fraser, T. R. et Elliott, E. A., Contributions to the study of the action of sea-snake venoms. *Proc. R. Soc.* **74,** 104, 1904.
[25] Fraser, T. R. et Elliott, E. A., Contributions to the study of the action of sea snake venoms Part I: Venoms of *Enhydrina valakadien* and *Enhydris curtus. Phil. Trans. R. Soc.* **197,** 249, 1905.
[26] Marsden, A. T. H. et Reid, H. A., Pathology of sea snake poisoning. *Br. Med. J.* **2,** 1290, 1961.
[27] Lee, S. Y., Lee, C. Y., Tseng, T. C. et Chiu, P. H., Pharmacological properties of cardiotoxin isolated from *Naja naja atra* venom. *Simp. Int. Venenos Animais. Mem. Inst. Butantan*, Suppl. Commemorativo, **33,** 1966 (sous presse).
[28] Tamiya, N. et Arai, H., Studies on sea snake venoms. *Biochem. J.* **99,** 624, 1966.
[29] Cheymol, J., Appréciation qualitative et quantitative d'une substance curarisante. *Thérapie* **12,** 321, 1957.
[30] Halstead, B. W.: *Dangerous Marine Animals.* Cambridge, Maryland: Cornell Maritime Press. 146 p., 1959.
[31] Rogers, L., On the physiological action of the poison of the Hydrophiidae. II. Action on the circulatory, respiratory and nervous system. *Proc. R. Soc.* **72,** 305, 1904.

INSTITUT DE PHARMACOLOGIE — FACULTÉ DE MÉDECINE — PARIS

ACTIONS NEUROMUSCULAIRES COMPARÉES DES VENINS DE TROIS NAJA (1)

(N. haje, N. nigricollis et N. naja)

PAR

J. CHEYMOL, F. BOURILLET ET M. ROCH-ARVEILLER

(Travail reçu le 3-3-1967).

De très nombreux travaux depuis ceux de BRUNTON et FAYRER en 1873 [6], ont été consacrés au mécanisme d'action du venin de *Naja naja* (cobra commun ou cobra des Indes). Par contre, les venins d'autres *Naja,* tels que le *N. haje* (cobra égyptien) et le *N. nigricollis* (serpent cracheur) ont été moins étudiés. Ils sont pourtant tout aussi actifs, et les morsures produites par ces serpents, de la famille des Elapidés, sont particulièrement dangereuses et redoutées. Le *Naja naja* est très répandu dans toute l'Asie; les deux autres sont africains, le *N. haje,* en Égypte et le *N. nigricollis,* plus particulièrement en Angola.

Nous nous proposons, dans le présent travail, d'analyser les effets neuromusculaires du venin de ces deux derniers serpents *(N. haje* et *N. nigricollis)* comparativement à ceux déjà bien connus du *N. naja.*

SUBSTANCES UTILISÉES — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

1. — *Venins*

Venin de *Naja naja* : Nous avons utilisé deux échantillons (2) du venin de *N. naja* récoltés au Viet-Nam, ainsi que deux autres échantillons de venin de *N. tripudians* (variété de *N. naja*) récoltés en 1932 et trouvés au laboratoire dans la collection personnelle du Professeur J. GAUTRELET. Tous les échantillons se présentent sous forme de poudres plus ou moins jaunes (venins déshydratés et grossièrement pulvérisés), ils ont été conservés à la température du laboratoire, sans précautions particulières. Les solutions, préparées avec de l'eau distillée, ont été renouvelées tous les deux ou trois jours, car elles perdent assez rapidement leur activité, même à + 4° C.

(1) Partie d'un travail faisant l'objet d'une thèse de Doctorat d'État de la Faculté des Sciences d'ORSAY, enrégistrée sous le n° 259 en 1967.

(2) Voir note (1) page suivante.

Les résultats expérimentaux obtenus avec ces quatre échantillons ont été qualitativement semblables, les différences d'ordre quantitatif étant dues aux variations individuelles d'activité, au prélèvement, aux procédés de déshydratation ou de conservation.

Venin de *N. haje* et de *N. nigricollis :* les échantillons (1) ont été utilisés sous forme de solutions aqueuses extemporanées.

2. — *Toxicités*

Déterminées sur lots de dix Souris Swiss de 18 à 22 g. Injections i/v de 0,3 ml en 20 sec. Observation des animaux pendant 48 h. Calculs selon la méthode de Karber et Behrens (4).

3. — *Préparations neuromusculaires* in situ

Rat. — Anesthésie : injection intrapéritonéale d'un mélange d'uréthanne (40 mg/100 g) et de mébubarbital (3 mg/100g). Respiration artificielle. Enregistrement des contractions du tibial antérieur : stimulation indirecte par le nerf sciatique 0,1 c/sec — 0,1 à 0,2 msec — 3 à 5 volts; stimulation (directe) du muscle 0,1 c/sec — 0,1 à 0,5 msec — 50 à 80 volts. Injection dans la veine jugulaire.

Dénervation chronique par ressection du nerf péronéal 8 à 10 jours avant expérience.

Chat. — Anesthésie : injection i/p ou i/v d'un mélange de chloralose (80 mg/kg) et de mébubarbital (15 mg/kg).

Même préparation que pour le Rat, mais en plus des contractions du tibial antérieur, muscle blanc (stimulation indirecte 0,1 c/sec — 0,2 à 0,4 msec — 4 à 5 volts, stimulation directe 0,1 c/sec — 0,2 à 0,4 msec — 50 à 80 volts), enregistrement des contractions d'un muscle rouge, le soléaire (stimulation indirecte seulement).

Pour les injections proches d'acétylcholine dans le muscle tibial antérieur (technique de G. L. Brown (7), un cathéter est placé à contre courant dans le bout périphérique de l'artère tibiale après avoir lié toutes les collatérales et enlevé le *m. extensor digitorum longus*. La stimulation du nerf sciatique est interrompue 2 minutes, pour permettre l'injection rapide d'ACh (2 à 10 mcg en tout) répétée régulièrement toutes les 15 min. Injection des venins dans la veine jugulaire.

4. — *Préparations isolées*

— *Diaphragme isolé de Rat.*

Technique de Bulbring (8) modifiée par J. Cheymol (10-14).

Bain de 50 ml de solution de Tyrode (NaCl 8 g — KCl 0,2 g — $CaCl_2$ 0,2 g — $MgCl_2$ 0,1 g — NaH_2PO_4 0,1 g — Glucose 1 g — $NaHCO_3$ 0,5 g p. 1000 ml) oxygéné par du carbogène. Stimulation indirecte du nerf phrénique 0,1 c/sec — 0,2 msec — 5 à 6 volts. Stimulation directe par deux électrodes négatives piquées dans le muscle, (1 immergée à la base, l'autre émergée au sommet) et l'électrode positive placée dans le bain : 0,1 c/sec — 0,2 msec — 50 à 80 volts.

— *Diaphragme dénervé.*

Ressection du nerf phrénique 8 à 10 jours avant l'expérience. Technique de Dale et Gaddum (18) adaptée au Rat par Vital Brazil (45). Addition régulière d'ACh (0,5 à 1 mcg/ml) toutes les 15 min : contact de 30 sec avec la préparation puis lavage continu

(1) Ces échantillons nous ont été aimablement fournis par le Dr. P. Boquet, chef du Service des Venins à l'Institut Pasteur (Annexe de Garches) que nous tenons à remercier tout particulièrement.

pendant 9 min 30 sec. Stimulation pendant les 5 min précédant la nouvelle addition d'ACh.

— *Enregistrement de potentiel d'action du nerf et du muscle et du potentiel de plaque motrice.*

Par électrodes externes, stimulation du nerf phrénique 1 c/sec — 0,05 à 0,1 msec — 2 à 3 volts. Enregistrement simultané, sur un oscillographe à deux canaux, du potentiel d'action du nerf et du potentiel d'action du muscle. Après suppression du potentiel musculaire, par action de 5×10^{-6} de *d*-tubocurarine pendant 5 à 8 min, enregistrement du potentiel de plaque. Bain de 20 ml de solution de Tyrode. Aération par carbogène.

— Rectus abdominis *isolé de Grenouille.*

Technique de Garcia de Jalòn (20).

Bain de 10 ml de solution de Ringer oxygénée par de l'air (Na Cl 6,2 g — KCl 0,13 g — NaH_2PO_4 0,019 g — $CaCl_2$ 0,11 g — $NaHCO_3$ 0,3 g pour 1000 ml).

Résultats Expérimentaux

I. — *Toxicité aiguë*

A. *Chez la Souris :* l'injection intraveineuse de solutions aqueuses des différents venins entraîne après une certaine latence, inversement proportionnelle à la dose administrée (10 min à la DL 100, 1 h à la DL 50) une gène respiratoire de plus en plus marquée avec agitation et cris des animaux. Aux doses létales, on observe la mort par paralysie (après 1 à 24 h), le cœur continuant à battre encore quelques secondes. Une hématurie est généralement constatée.

Il n'a pas été possible de noter de différences entre les symptômes d'intoxication aiguë par les différents venins.

Les DL 50 calculées selon la méthode de Kärber et Behrens ont été les suivantes :

— Échantillon de venin de *N. haje*	420 mcg/kg
— Échantillon de venin de *N. nigricollis*	710 mcg/kg

Pour les différents échantillons de *N. naja,* des variations sensibles ont été constatées :

— Premier échantillon (1)	DL 50 :	850 mcg/kg
	DL 100 :	1000 mcg/kg
— Deuxième échantillon	DL 50 :	390 mcg/kg
	DL 100 :	500 mcg/kg

(1) C'est avec cet échantillon que l'étude pharmacologique comparative complète a été effectuée. Les autres échantillons ont fait seulement l'objet d'expériences de confirmation.

Enfin pour les deux venins récoltés en 1932, les DL 50 ont été de :
435 mcg/kg pour celui conservé en tube de verre bouché par du coton
360 mcg/kg pour celui conservé en tube scellé.

Tous ces chiffres sont évidemment du même ordre, mais montrent la possibilité de variations d'un échantillon à l'autre.

B. *Chez le Poussin :* Les différents venins injectés dans la veine jugulaire du poussin de huit jours agissent, comme chez la Souris, avec une certaine latence fonction de la dose administrée; peu à peu l'animal s'affaisse, ses ailes tombent tandis qu'apparaît une gêne respiratoire qui conduit pour les doses létales à une mort par asphyxie.

Le Poussin est plus sensible que la Souris aux venins de *Naja*; les DL 50 n'ont pas été déterminées avec précision (nombre d'animaux insuffisant) mais se situent entre 50 et 200 mcg/kg pour les différents échantillons étudiés.

II. — *Mise en évidence de l'action neuromusculaire*

Comme sur l'animal non anesthésié, on observe sur préparations neuromusculaires isolées ou *in situ,* des paralysies lentes à apparaître comme à progresser (Fig. 1). La latence et le temps pour obtenir une paralysie totale sont d'autant plus longs que la dose est plus faible, la dose minimale active est donc difficile à déterminer.

Lorsqu'une dose donnée a été active, il n'a jamais été possible de mettre en évidence de réversibilité, même partielle.

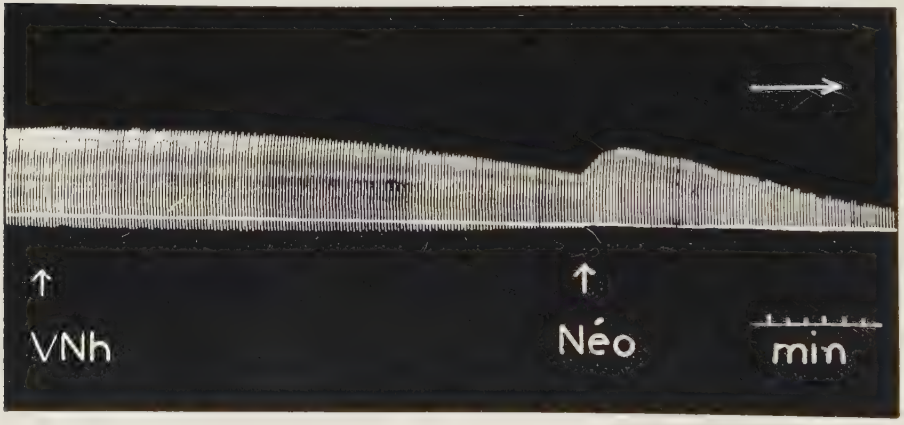

Fig. 1

Préparation neuromusculaire *in situ* de Rat.
à ↑ V. Nh. : 250 mcg/kg i/v de venin de *Naja haje.*
à ↑ Néo. : 200 mcg/kg i/v de néostigmine.

A. *Sur préparations neuromusculaires* in situ *de Rat,* le venin de *N. haje* s'est montré le plus actif : la dose minimale active est voisine de 100 mcg/kg alors que celles des venins de *N. nigricollis* et de *N. naja* se situent entre 200 et 250 mcg/kg. Même à ces doses minimales, les trois venins provoquent, au moment de l'injection, une chute brutale de la pression artérielle, lentement et partiellement réversible, pouvant atteindre 6 cm de Hg. L'hypotension est quelquefois accompagnée d'arythmie.

Cette action cardiovasculaire est particulièrement importante avec le venin de *N. nigricollis* et rend très difficile à la fois la conduite des expériences et leur interprétation. La pression artérielle a été surveillée à tout instant car une hypotension trop profonde entraîne une diminution de l'amplitude des contractions musculaires. Or les doses minimum sont, chez le Rat et le Chat anesthésiés, fortement hypotensives lorsqu'elles sont administrées en une seule injection. Toutefois, ces mêmes doses injectées en deux ou trois fois entraînent une moindre hypotension, tout en restant paralysantes. Cet artifice nous a permis de mener à bien les expériences avec le venin de *N. nigricollis.*

Le venin de *N. haje* est faiblement hypotenseur aux doses paralysantes, alors que celui de *N. naja* entraine, à ces doses, des hypotensions marquées (4 à 3 cm Hg) sans, toutefois, jamais atteindre le collapsus vasculaire.

B. *Sur la préparation nerf phrénique-diaphragme isolée de Rat :* l'action paralysante des venins de Cobra se manifeste lentement, après latence et n'est jamais réversible. La paralysie est le plus souvent précédée d'une contracture prolongée de la préparation, dont l'amplitude et le délai d'apparition sont fonction de la concentration du bain en venins. Cette contracture diminue ou disparaît par lavage de la préparation mais est susceptible de réapparaître, par la suite, spontanément avec une plus faible amplitude (Fig. 2).

Le venin de *N. nigricollis,* à la concentration seuil de 2 à 3 mcg/ml est très lentement paralysant mais fortement contracturant. Celui de *N. haje* est paralysant à partir de 1 mcg/ml mais faiblement contracturant. Le venin de *N. naja* est actif à des concentrations voisines de celles de *N. nigricollis* mais ses propriétés contracturantes sont un peu plus faibles.

Ces effets contracturants n'ont jamais été observés sur les préparations neuromusculaires *in situ* mais se retrouvent, par contre, sur l'iléon isolé de Cobaye ou sur le *rectus abdominis* de Grenouille à des concentrations assez fortes, égales ou supérieures à 10 mcg/ml.

D'après les observations de plusieurs auteurs [24] [30] [35] [41], il convient de séparer l'action paralysante des venins de Cobra, due à une neurotoxine, de l'action contracturante observée sur organes isolés, due à une cardiotoxine responsable, sur l'animal entier, des effets cardio-vasculaires. Ces deux propriétés seront donc analysées séparément, mais un caractère commun peut, néanmoins, être affirmé : elles s'exercent à un niveau périphérique.

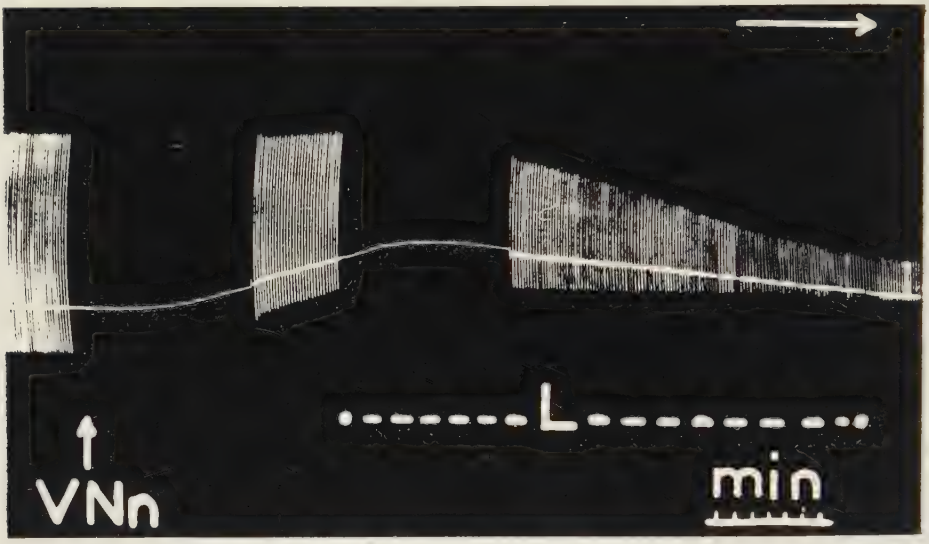

FIG. 2

Préparation isolée nerf phrénique-diaphragme de Rat.
à ↑ V. Nn : 7,5 mcg/ml de venin de *Naja naja*.
en — L — : Lavage.
Avant l'addition du venin et avant le début du lavage, arrêt de la stimulation électrique du nerf phrénique.

III. — *Mécanisme d'action*

A. *Action contracturante*

Elle s'observe sur le diaphragme isolé de Rat en dehors de toute stimulation électrique de cette préparation (FIG. 2), sur *rectus abdominis* de Grenouille et sur iléon de Cobaye.

Sur le diaphragme, les ions calcium ($CaCl_2$: 200 mcg/ml) et magnésium ($MgSO_4$: 500 mcg/ml) ajoutés au bain en même temps que le venin réduisent, ou empêchent, l'apparition de la contracture sans modifier celle de la paralysie. Mais dès que la préparation est lavée, l'action

protectrice de ces ions, moins solidement fixés que les protéines du venin, est supprimée et la contracture apparaît ou augmente. Cet effet préventif (1) que les ions calcium et magnésium exercent en commun permet d'envisager une hypothèse quant à l'origine de la contracture. On sait, en effet, que les ions Ca^{++} et Mg^{++} ont des actions opposées sur les terminaisons nerveuses motrices, respectivement stimulantes et dépressives, mais des effets parallèles, dépresseurs, au niveau de la fibre musculaire. Il semble donc, *a priori,* que la contracture résulte d'une action du venin sur les fibres musculaires.

Cette hypothèse est confirmée par la persistance de l'effet contracturant des venins de *Naja* sur les préparations préalablement paralysées par la *d*-tubocurarine ou chroniquement dénervées. La nature musculaire de cette contracture ne semble donc pas faire de doute.

B. *Action paralysante.*

L'action paralysante des venins de *Naja,* parfois difficile à mettre en évidence du fait de sa grande lenteur et de la contracture préalable observée sur les seules préparations isolées, est susceptible de s'exercer sur un ou plusieurs chainons de la transmission neuromusculaire présynaptique (structure nerveuse) ou post-synaptique, sur les récepteurs spécifiques de la plaque ou sur la fibre musculaire elle-même.

a) *Action pré-synaptique.*

La latence et la lenteur de la paralysie conduit à comparer l'action des venins de Cobra à celle de l'hémicholinium qui inhibe, par blocage du transport de la choline au niveau des terminaisons nerveuses, la biosynthèse du transmetteur acétylcholinique : la paralysie se produit lorsque les réserves de ce transmetteur sont épuisées.

Sur une préparation neuromusculaire *in situ* ou isolée, la paralysie par hémicholinium se manifeste d'autant plus rapidement que la fréquence de stimulation est plus grande. Avec les différents échantillons de venins, l'augmentation de la fréquence 10 fois (1 c/sec) ou 100 fois (10 c/sec) n'a pas fait apparaître de paralysie aux doses infraliminaires ni pratiquement modifié la pente d'une paralysie obtenue avec des doses plus élevées.

En enregistrant les potentiels d'action de nerfs isolés (sciatique de Grenouille ou phrénique de Rat), nous n'avons constaté après action, même prolongée (1 h 30), des différents venins de *Naja* (concentration 5×10^{-6} à 1×10^{-5}) aucune modification des potentiels d'action.

(1) L'action des ions est moins nette lorsque la contracture est déjà établie.

À des concentrations nettement paralysantes, la conduction le long du nerf, n'est pas inhibée.

Ainsi, nos expériences n'ont apporté aucune preuve d'une atteinte présynaptique susceptible d'être à l'origine des effets paralysants des venins de *Naja*.

b) *Action sur la fibre musculaire.*

La stimulation directe ou indirecte alternée d'une préparation neuromusculaire permet de vérifier si la fibre musculaire reste contractile pendant une paralysie.

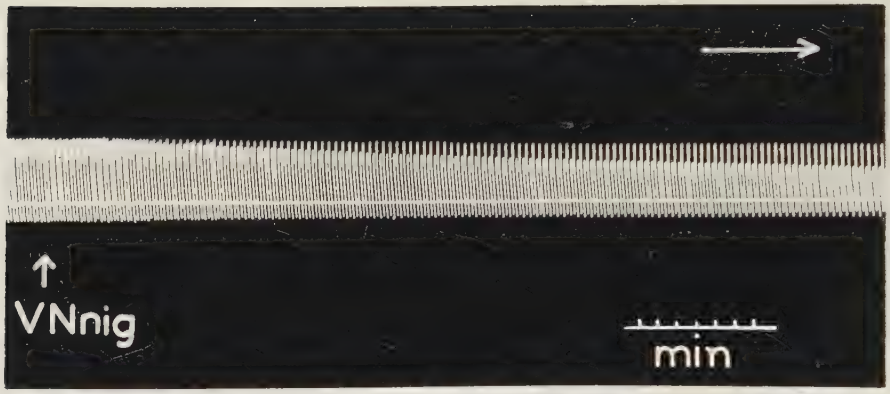

FIG. 3

Préparation neuromusculaire *in situ* de Rat. Stimulations directe et indirecte alternées.
à ↑ V. Nnig. : 200 mcg/kg i/v de venin de *Naja nigricollis*.
Injection réalisée en 2 temps.
— Au temps t-30 min = (non figuré sur le tracé) première dose de 150 mcg/kg, sans effet paralysant.
— Au temps $t = 0$ = deuxième dose de 50 mcg/kg diminuant, presque sans latence, l'amplitude des contractions obtenues par stimulation du nerf (indirecte).

Ainsi, sur le tibial antérieur *in situ* de Rat, après administration de venin de *Naja* (*N. nigricollis* sur la FIG. 3), on constate sur les contractions obtenues par stimulation du nerf, la paralysie lente caractéristique alors que les contractions obtenues par stimulation directe de la fibre musculaire restent pratiquement de même amplitude, même pendant une période prolongée (5 ou 6 h). De plus l'injection ultérieure de fortes doses de venin (2 à 4 fois la dose initiale paralysante) ne modifient absolument pas l'amplitude de ces contractions « directes ».

Sur le diaphragme isolé, l'interprétation de telles expériences est rendue délicate par l'interférence des phénomènes de contracture qui

modifie la « ligne de base » des tracés, et empêche ainsi la comparaison précise des amplitudes. Cependant, comme un peut le voir sur la Fig. 4 avec le venin de *N. haje,* la disparition totale des contractions indirectes laisse seules persister les contractions obtenues par stimulation directe du muscle.

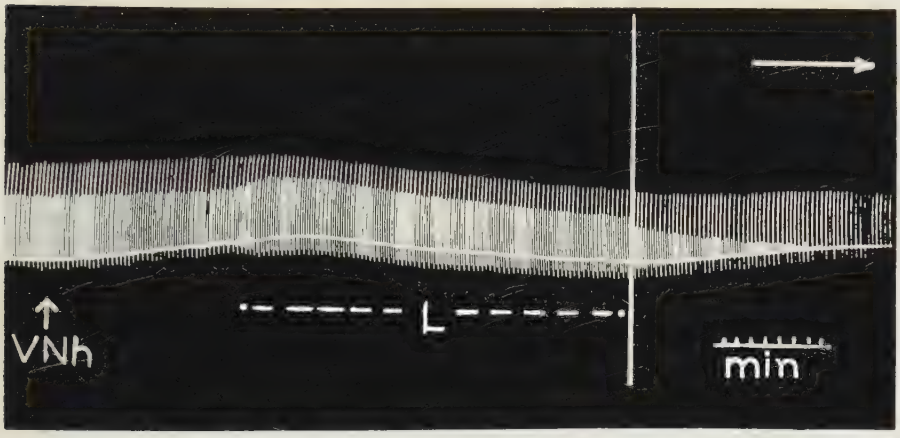

Fig. 4

Préparation isolée nerf phrénique-diaphragme de Rat.
Stimulations directe et indirecte alternées.
à ↑ V. Nh. : 4 mcg/ml de venin de *Naja haje.*
en — L — : lavage.
La deuxième partie du tracé (1 h après venin) montre l'amorce d'une contracture spontanée en même temps que l'arrêt total des contractions obtenues par stimulation indirecte.

De même, sur des préparations neuromusculaires isolées ou *in situ* chroniquement dénervées et stimulées directement, les différents venins de *Naja* n'entraînent aucune paralysie aux doses actives sur préparations normales.

Toutes ces expériences tendent donc à prouver l'intégrité des systèmes contractiles musculaires au cours de l'empoisonnement par les venins de Cobra.

c) *Action sur les récepteurs de la plaque motrice.*

N'agissant ni sur les structures pré-synaptiques, ni sur la fibre musculaire, les venins de *Naja* ne peuvent intervenir dans la transmission neuromusculaire qu'au niveau des récepteurs de la plaque. Plusieurs types d'expériences permettent de confirmer ce mécanisme d'action.

Des injections proches d'ACh dans le muscle tibial antérieur *in situ*

de Chat provoquent normalement une réponse contractile par dépolarisation des récepteurs de la plaque. Après administration intraveineuse d'une dose non paralysante d'un venin de *Naja* (200 à 250 mcg/kg pour *N. haje*), la réponse contractile à la stimulation chimique diminue progressivement pour s'annuler au bout de 30 à 40 minutes (Fig. 5). Cette inhibition quelquefois faiblement réversible lorsqu'elle est incomplète est le plus souvent totalement irréversible. Les venins de *Naja* diminuent donc la sensibilité des récepteurs post-synaptiques à l'ACh, à des doses qui ne diminuent même pas les réponses contractiles par stimulation électrique du nerf.

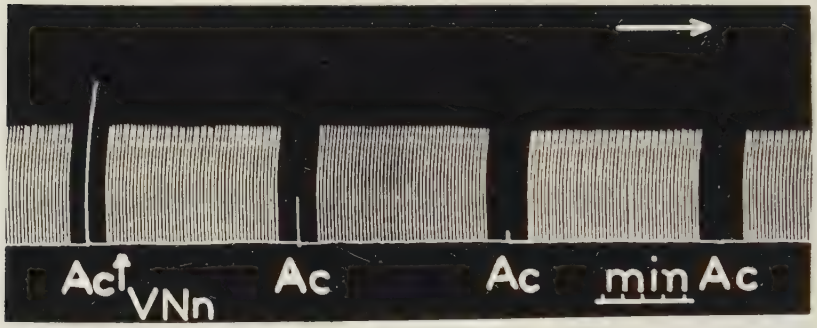

Fig. 5

Contractions du tibial antérieur *in situ* de Chat obtenues par stimulation électrique ou chimique.

Stimulation électrique du nerf sciatique : 0,1 c/sec — 5 V — 0,2 msec.

Stimulation chimique en Ac: injection proche et très rapide de 3,75 mcg d'ACh dans l'artère tibiale.

en ↑ V. Nn : 250 mcg/kg i/v de venin de *Naja naja*.

De même, un diaphragme isolé de Rat sensibilisé par dénervation chronique préalable, répond normalement à l'addition au bain d'acétylcholine. L'addition de venin de *Naja,* même à doses faibles (1 mcg/ml pour *N. haje* — 2 mcg/ml pour *N. nigricollis* et *N. naja*), non paralysantes sur des préparations normalement innervées, entraîne une diminution irréversible de la réponse contractile à l'ACh (Fig. 6).

Sur le *rectus abdominis* isolé de Grenouille, ces venins diminuent puis suppriment la contracture acétylcholinique. L'action est lente à s'établir pour les faibles doses mais elle est pratiquement irréversible. Une dose de 1 mcg/ml de venin de *N. nigricollis* ou de *N. naja* appliquée pendant 3 min à la préparation, entraîne, en 20 min, une abolition presque totale de la réponse contractile; le venin de *N. haje* agit, là encore, à concentration plus faible (0,5 mcg/ml — Fig. 7)

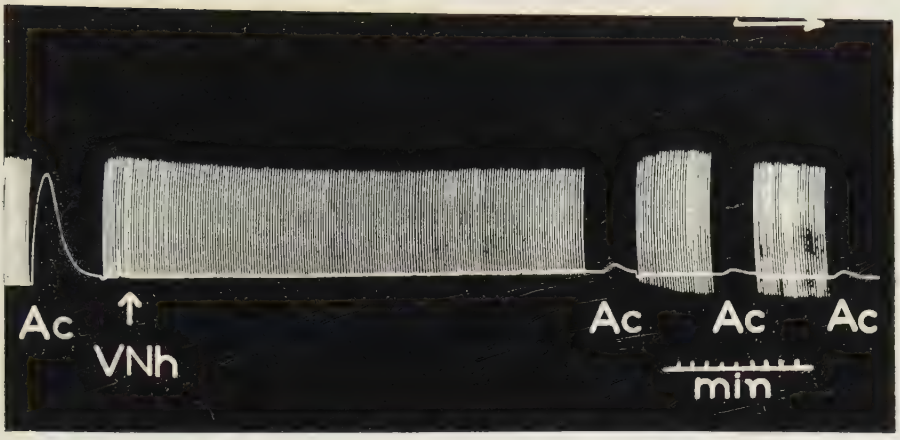

FIG. 6

Diaphragme chroniquement dénervé et isolé de Rat.
En Ac : addition de 0,75 mcg/ml d'ACh sans stimulation électrique.
En ↑ V. Nh : Action de 1 mcg/ml de venin de *Naja haje* pendant 30 min.

Par contre, ces mêmes venins n'ont aucun effet inhibiteur vis-à-vis de la contracture par les ions potassium. Même de très fortes doses elles-mêmes contracturantes, sont incapables de modifier la sensibilité

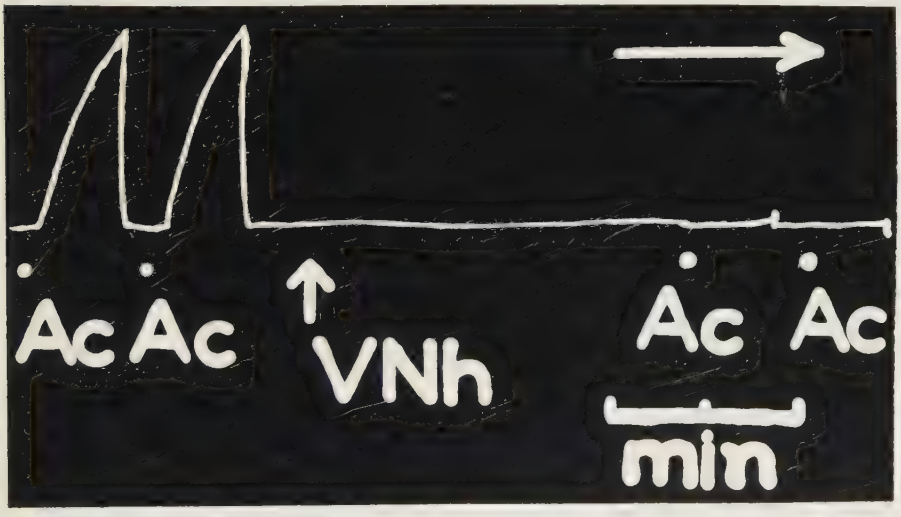

FIG. 7

Rectus abdominis isolé de Grenouille.
en Ac : 1 mcg/ml d'ACh pendant 1 min.
à ↑ V. Nh. : 0,5 mcg/ml de venin de *Naja haje* pendant 5 min.
La dernière addition d'ACh est faite 15 min après venin.

du *rectus* au potassium. L'effet inhibiteur s'exerce donc sur les seuls récepteurs sensibles à l'acétylcholine.

Ainsi, sur muscle normalement innervé (Chat), sur muscle chroniquement dénervé (Rat) et sur *rectus abdominis* de Batraciens, les venins de *Naja* à doses faibles insensibilisent les récepteurs spécifiques à l'ACh exogène, il est permis de supposer qu'il en est de même vis-à-vis du transmetteur physiologiquement libéré.

La paralysie que produisent les venins de Cobra, résulte donc d'un blocage des récepteurs spécifiques de la plaque motrice comme le font les substances curarisantes, mais ce blocage est très long et pratiquement irréversible.

Les antagonistes de la curarisation, la néostigmine, par exemple, sont capables d'agir sur une paralysie provoquée par les venins de *Naja* mais l'action est partielle et surtout fugace, comme on peut le voir sur la Fig. 1 : après un antagonisme éphémère, la paralysie reprend inéluctablement sa progression.

Nous avions montré dans un précédent travail [12], la sensibilisation

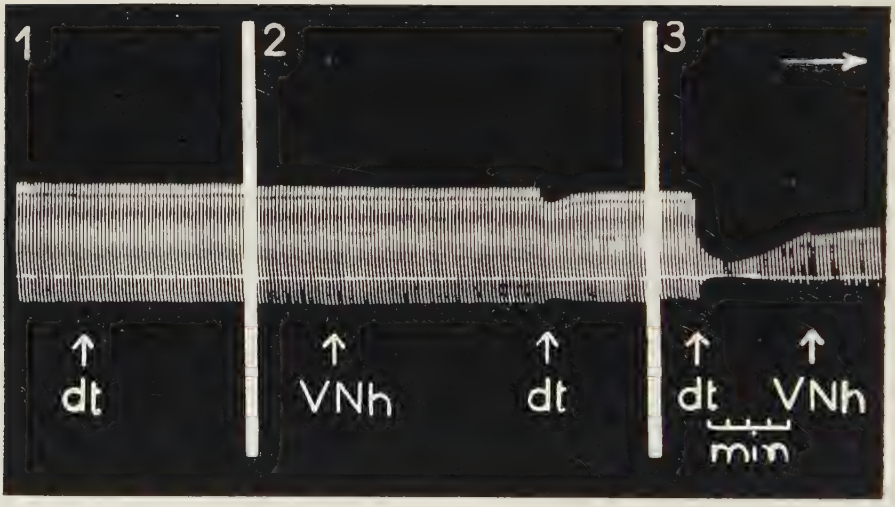

FIG. 8

Préparation neuromusculaire *in situ* de Rat.

Sensibilisation à l'action paralysante de la *d*-tubocurarine sous l'influence du venin de *Naja haje*.

1. — à ↑ dt : 20 mcg/kg de *d*-tubocurarine *t*-20 min.
2. — à ↑ V. Nh : 50 mcg/kg i/v de venin de *Naja haje* $t = 0$.
   à ↑ dt : 20 mcg/kg de *d*-tubocurarine $t + 10$ min.
3. — à ↑ dt : 20 mcg/kg de *d*-tubocurarine $t + 40$ min.
   à ↑ V. Nh : 50 mcg/kg i/v de venin de *Naja haje* $t + 46$ min.

à la *d*-tubocurarine, que produisait le venin de *N. naja*. Reprenant des expériences identiques, avec les deux autres venins nos conclusions sont tout-à-fait comparables, aux doses près. Sur préparation neuromusculaire isolée (diaphragme de Rat), l'activité de la *d*-tubocurarine est doublée par addition préalable de faibles doses, non paralysantes, de venin (0,5 à 1 mcg/ml de *N. nigricollis* ou de *N. haje*). De même, sur préparation *in situ,* une dose inactive de *d*-tubocurarine peut être répétée 6 à 8 fois sans entraîner le moindre signe de paralysie; après venin, cette même dose devient nettement active 10 min et surtout 40 min plus tard : la Fig. 8 montre cette sensibilisation par 50 mcg/kg i/v de venin de *N. haje*.

Cette sensibilisation est spécifique des seuls curarisants, car avec la succinylcholine il ne se produit pas de sensibilisation, mais parfois un antagonisme.

Discussion — Essais d'Interprètation

Dans les divers types d'expériences que nous venons de rapporter, les deux échantillons de venins de *N. haje* et de *N. nigricollis* présentent des propriétés comparables à celles du venin de *N. naja*. Les différences observées entre ces échantillons doivent être considérées comme des nuances, certes bien marquées, dans des propriétés et des mécanismes d'action voisins, sinon identiques. Nos résultats sont d'ailleurs en accord avec les données de la littérature sur le Cobra indien.

Peut-on généraliser ces différences entre échantillons de venins de divers *Naja,* aux trois espèces correspondantes ? Il aurait fallu, pour répondre, disposer de plusieurs échantillons de chacune des espèces et d'en effectuer une étude comparative. Les difficultés d'approvisionnement en venins rendent une telle étude impossible. Dans le cas du *N. haje* et du *N. nigricollis,* un seul échantillon a été expérimenté : nos conclusions ne vaudront donc que pour cet échantillon. Par contre, pour le *N. naja,* les quatre échantillons présentent des propriétés qualitativement homogènes malgré les différences d'origine, de récolte, de temps de conservation et de toxicité.

Si la valeur des DL 50 varie d'un venin à l'autre (0,36 à 0,85 mg/kg i/v Souris) les symptômes observés au cours de l'envenimation aiguë sont très voisins et comparables aux effets de la morsure de Cobra chez l'Homme (Ahuja et Singh [1] Purananda [37] — Werler et Keegan [46]) : douleurs (cris) puis faiblesse musculaire, gêne respiratoire apparaissant après latence et enfin mort par asphyxie, quelquefois au bout de 24 h.

Le symptôme dominant de l'intoxication aussi bien chez l'Homme que chez la Souris ou le Poussin est donc une paralysie motrice. L'analyse de cette action paralysante sur préparations myoneurales *in situ* ou isolées nous permet d'en définir les caractéristiques principales, variables suivant les venins et d'en préciser les lieux d'action sur les différentes structures assurant la transmission neuromusculaire.

I. *Caractéristiques principales.*

Il ressort de la présente étude que les venins de *N. haje* et *nigricollis* comme celui de *N. naja,* entraînent une paralysie de nature périphérique, se manifestant après une certaine latence, lentement progressive et pratiquement irréversible. Elle est le plus souvent accompagnée de contracture sur les préparations isolées.

a) *Action périphérique.*

La nature périphérique de l'action paralysante est démontrée par le fait qu'elle se manifeste sur préparations *in situ* dont le nerf est sectionné ou lié, et sur préparations isolées. Toutefois, ceci n'exclut pas la possibilité d'une composante centrale supplémentaire. La comparaison des doses actives sur animaux entiers et sur préparations neuromusculaires rend très peu probable ou très minime la participation des centres à l'action paralysante. Cette question a fait l'objet de nombreuses controverses concernant en particulier la paralysie respiratoire. Si certains auteurs (Aron [2], Wolmer [47], Elliot [19], Ragotzi [38]) admettent une action dépressive centrale, d'autres (Lee et Peng [32], Vick et coll. [44]) fournissent des arguments décisifs sur l'origine exclusivement périphérique de la paralysie comme l'avaient admis auparavant Brunton et Fayrer [6], Arthus [3], Kellaway [28], Houssay et coll. [27].

Guyot et Boquet [23] confirment la nature périphérique de l'action paralysante en administrant, comparativement, du venin de *N. nigricollis* par voie générale (veine de l'oreille) et dans le cerveau (lobe temporal droit) de Lapin : dans le premier cas il y a paralysie, dans le second cas, à doses beaucoup plus faibles, il se produit des crises convulsives sans traces de paralysie.

b) *Évolution dans le temps de la paralysie.*

Quelles que soient les conditions expérimentales et quel que soit le venin utilisé, on constate toujours une latence et une progression très lente de la paralysie, inversement proportionnelles à la quantité de

venin administrée. Ainsi lors des déterminations des DL 50 chez la Souris les délais d'apparition des premiers symptômes de paralysie peuvent varier de 10 min à 1 h et la mort de 1 h à 24 h. Sur une préparation neuromusculaire *in situ*, une dose capable d'entraîner une paralysie très lente, totale, par exemple 90 min à 2 h après l'injection i/v de venin, ne manifeste ses premiers signes d'activité qu'après 30 min environ.

Il n'a pas été possible de diminuer les doses actives et de raccourcir l'évolution de la paralysie en injectant directement les venins dans l'artère irrigant la patte en expérience. Ceci tendrait à prouver que la latence et l'évolution lente résultent plutôt d'une difficulté pour les protéines actives du venin de pénétrer jusqu'à leurs lieux d'action, que la mise en jeu de phénomènes enzymatiques lents. Nous n'avons, toutefois, sur ce point, aucun argument décisif.

Expérimentalement parlant, nous pouvons dire que l'action des différents venins est irréversible ; jamais après administration de quantités de venins même à la limite d'une activité détectable, il n'a été possible d'obtenir de réversibilité : ou bien une dose est inactive, ou bien elle est active mais irréversible. Pourtant, lors d'une étude antérieure [12], nous avons pu mettre en évidence chez le Lapin, la réversibilité spontanée d'une action dépressive neuromusculaire du venin de *N. naja* (sensibilisation aux curarisants) ; une injection i/v unique de venin augmente pendant plusieurs jours la sensibilité des animaux vis-à-vis de la *d*-tubocurarine (sensibilité suivie régulièrement par le test de la chute de la tête) ; la réversibilité de cet effet varie en fonction de la dose de venin, 2 jours pour 50 mcg/kg et 9 jours pour 80 mcg/kg [1]. On comprend ainsi que des doses 6 à 10 fois plus élevées, indispensables pour mettre en évidence des effets paralysants propres, ne soient pas réversibles dans le temps d'une expérience aiguë.

c) *Action contracturante.*

À côté de l'action paralysante, les trois types de venins entraînent une contracture lente et durable des seules préparations neuromusculaires isolées (diaphragme, *rectus*). Cet effet contracturant se manifeste chronologiquement avant la paralysie, c'est-à-dire, que le délai d'apparition est toujours plus court mais les doses contracturantes varient d'un type de venin à l'autre et se dissocient des doses paralysantes.

En effet, à des doses entraînant des effets paralysants faibles approximativement comparables, l'échantillon de venin de *N. nigricollis* s'est montré très nettement contracturant alors que celui de *N. haje* l'est

[1] Il n'a malheureusement pas été possible d'effectuer une étude semblable avec les venins de *N. haje* et *N. nigricollis* en raison des quantités importantes qu'elle nécessite.

peu ou pas; les différents échantillons de *N. naja* exercent une contracture moyenne.

Cette action contracturante du venin de cobra avait été observée et différenciée de l'action paralysante par HOUSSAY et coll. [24], [27] qui notaient déjà la différence de réaction entre préparations isolées et animaux entiers [26]. Cette différence de réaction est effectivement assez remarquable; sur animal entier (préparations *in situ*), il n'a jamais été possible de provoquer, quelle que soit la dose administrée par voie veineuse, la moindre contracture. Par contre, il est constaté sur ces préparations une dépression cardiovasculaire variant selon les échantillons parallèlement aux propriétés contracturantes sur préparations isolées : importante pour le *N. nigricollis*, moyenne pour le *N. naja* et faible pour le *N. haje*.

Ce parallélisme entre action dépressive cardiovasculaire sur animal entier et activité contracturante sur préparations isolées apportent un argument supplémentaire à l'hypothèse de MELDRUM selon laquelle la cardiotoxine étudiée par SARKAR et coll. [40] [41] la DLF (facteur hémolytique à action directe) de CONDREA et coll. [16] et la fraction dépolarisante du muscle (MELDRUM [33]) seraient une même fraction polypeptidique basique différente de la fraction paralysante. Une récente étude de LEE et coll. [31] sur les propriétés de la cardiotoxine confirme ses effets contracturants sur préparations isolées.

Nous avions parlé de « nuances » entre les actions de trois types d'échantillons de venins, celles-ci proviennent vraisemblablement des proportions relatives variables en fraction paralysante et en fraction cardiotoxique contracturante.

II. — *Mécanismes d'action.*

Quelles conclusions pouvons-nous tirer de nos expériences sur le mécanisme des différentes actions dont les caractéristiques viennent d'être définies ?

a) *Action pré-synaptique.*

La partie pré-synaptique de la transmission neuromusculaire présente de nombreux points sensibles aux agents paralysants (voir à ce sujet [5], [43]). Deux principaux, mis en cause dans la littérature sur les venins de Cobra peuvent être évoqués, la conduction du potentiel d'action le long de l'axone et la synthèse de l'acétylcholine.

En ce qui concerne la conduction du potentiel d'action du nerf nos expériences sur nerf sciatique de Grenouille ou phrénique de Rat, ont

montré que des concentrations nettement paralysantes (5×10^{-6} à 1×10^{-6}) des trois types de venins de *Naja,* laissaient absolument intacts les potentiels d'action même après 1 h ou 1h 30 de contact. Un effet sur la conduction nerveuse doit donc être exclu.

Ceci rejoint les résultats de Rosenberg et Podleski [39] qui sur l'axone de Seiche, n'observaient aucune modification des potentiels avec 10 mcg/ml de venin de *N. naja*; par contre, ils constatent pour des concentrations plus élevées une baisse du potentiel, comme Narahashi et Tobias [36], sur l'axone de Homard. Mais ces concentrations sont très largement supérieures aux concentrations paralysantes et correspondent pour des organismes entiers à des doses dépassant largement les doses mortelles. Il paraît donc difficile — et ceci rejoint nos conclusions — de faire intervenir une inhibition de la conduction nerveuse dans le mécanisme de la paralysie entraînée par les venins de *N. haje, N. nigricollis* et *N. naja.*

Agiront-ils par inhibition de la synthèse du transmetteur chimique, l'acétylcholine, au niveau des terminaisons nerveuses motrices ? Sans écarter la possibilité d'une telle inhibition dans une deuxième phase de l'envenimation, nos arguments expérimentaux éliminent l'hypothèse de ce mécanisme comme origine de l'action paralysante des venins de *Naja.* En effet, dans le cas d'une paralysie lente due à un défaut de synthèse de transmetteur, l'augmentation de la fréquence de stimulation épuise plus rapidement les réserves qui se trouvent normalement dans les terminaisons nerveuses et fait apparaître plus tôt, ou accélère, la paralysie : en aucune expérience et avec aucun des échantillons de venin, l'augmentation de fréquence de stimulation du nerf (10 à 100 fois) n'a fait apparaître ou intensifié la paralysie.

Cependant, plusieurs auteurs, Ghosh, de et Sarkar [22] sur homogénats de cerveaux, Lee [29] et Lee et Chang [30] sur diaphragmes de Rat, ont démontré que les venins de Cobra étaient capables d'inhiber la formation d'acétylcholine.

Comment expliquer ces divergences avec nos conclusions ? Les travaux de Lee et coll. [29] [30] ont permis de préciser, que contrairement au venin total, la « najatoxine » principale fraction paralysante, n'exerce aucun effet sur la synthèse de l'acétylcholine, il existe donc un autre mécanisme d'action par lequel agit la toxine et qui intervient de façon prépondérante dans l'action du venin total.

Toutefois, comme nous avons travaillé avec les venins totaux, nous aurions dû retrouver un effet, même partiel, sur la synthèse de l'acétylcholine. Le fait que nous n'ayons rien retrouvé par la technique d'augmentation de fréquence de stimulation peut fort bien s'expliquer par

un décalage dans le temps de l'action paralysante et de l'inhibition de la synthèse du transmetteur : en effet, CHANG et LEE [9] ont montré que dans le venin de *Bungarus multicinctus,* élapidé voisin des cobras, les fractions (β et γ) actives sur la synthèse d'acétylcholine présentaient une latence beaucoup plus grande que la fraction (α) paralysante, comparable à la najatoxine.

Nous admettrons donc, en conclusion, que l'action paralysante des venins de *N. haje, N. nigricollis* ou *N. naja* n'est pas le résultat d'une inhibition à un niveau pré-synaptique, mais qu'un tel effet sur la synthèse ou la libération du transmetteur serait susceptible d'intervenir dans un second temps, prenant ainsi le relais de la paralysie initiale.

Des recherches préliminaires effectuées par ZACKS et SHEFF [48] sur la structure de plaques motrices de souris tuées par injection de venin de *N. haje* semblent montrer, au microscope électronique, que le nombre de vésicules synaptiques n'est pas diminué sous l'effet du venin. Ces observations tendraient à prouver que la mort par paralysie n'est pas due à un défaut de synthèse du transmetteur.

b) *Action musculaire directe.*

L'action contracturante des différents échantillons de venins de Cobra, que nous avons nettement dissociée de l'action paralysante, est une action musculaire directe ; en effet, elle se manifeste encore après curarisation ou dénervation chronique des préparations isolées. Ces conclusions confirment celles de SARKAR [22] [40] [41] et celles de MELDRUM [33] [34] [35] qui admettent que la fraction cardiotoxique est responsable de cet effet. L'action inhibitrice qu'exercent à la fois les ions Ca et Mg, montre que la contracture résulte d'une modification de la perméabilité de la membrane musculaire. Cette hypothèse rejoint celle de SARKAR [40] qui constate la disparition de la contracture par le venin de Cobra dilué après lésion de la membrane d'une fibre musculaire isolée du *sartorius* de Grenouille, par le glycérol. MELDRUM [34], sur fractions séparées par électrophorèse met en évidence une dépolarisation du *sartorius* de Grenouille après application d'un polypeptide basique migrant rapidement vers la cathode. La caractéristique la plus curieuse de cette contracture est de se manifester seulement sur les préparation isolées et pas sur les préparations *in situ.*

L'action paralysante des trois types de venins ne peut être due à un effet sur la fibre musculaire elle-même. Nos expériences sur préparations neuromusculaires isolées ou *in situ,* avec stimulation alternée du nerf et du muscule, sont probantes, à ce sujet ; alors que les contractions indirectes sont totalement paralysées, les contractions directes restent

insensibles même à des doses répétées et relativement élevées de venins. Il en est de même sur les contractions « directes » de muscles chroniquement dénervé. GAUTRELET et coll. [21] et CICARDO [15] par des mesures de chronaxie, avaient été amenés à des conclusions comparables.

Pourtant, certains auteurs HOUSSAY et GUGLIELMETTI [25] KELLAWAY [28], SARKAR et MAITRE [41] avec les venins de *N. naja* sur préparation sciatique gastrocnémien de Grenouille puis C. SU [42] avec du venin de *N. naja atra* sur préparation phrénique diaphragme de Rat, admettent une action dépressive directe sur l'excitabilité musculaire. Ce dernier auteur fait bien remarquer que les doses nécessaires sont très fortes (30 fois environ les doses paralysantes) et que cette action musculaire directe ne peut constituer le mécanisme principal de l'effet paralysant.

Nous n'avons pas essayé de telles doses sur préparations isolées; elles sont, d'autre part, bien supérieures aux doses mortelles et impossibles à utiliser sur animaux entiers. On peut alors se demander si de tels effets musculaires directs sont susceptibles d'intervenir chez l'Homme dans la paralysie qui suit la morsure par un cobra.

c) *Action sur les récepteurs de la membrane post-synaptique.*

À la suite de la plupart des auteurs qui ont analysé le mécanisme de la paralysie entraînée par les venins de *N. naja,* nous pouvons dire que les récepteurs de la membrane post-synaptique constituent le lieu d'action essentiel des fractions paralysantes des 3 types de venins de *Naja* que nous avons étudiés; un ensemble de résultats expérimentaux conduisent à de telles conclusions :

— annulation de potentiels de plaque motrice

— blocage des récepteurs du diaphragme dénervé de Rat, du tibial antérieur de Chat *in situ,* du *rectus abdominis* de Grenouille qui deviennent lentement et de façon pratiquement irréversible, insensibles à l'action stimulante de l'acétylcholine.

— sensibilisation d'animaux entiers, ou de préparations isolées ou *in situ* à l'action paralysante de la *d*-tubocurarine.

L'action paralysante des échantillons de venin de *N. haje* et de *N. nigricollis* s'exerce donc comme celles de venin de *N. naja,* par un blocage très lent et pratiquement irréversible des récepteurs spécifiques de la plaque motrice. Cependant, ce caractère lent et irréversible ne permet pas d'assimiler cette paralysie à une curarisation car l'antagonisme avec l'acétylcholine n'a aucun caractère compétitif. D'ailleurs, l'action des antagonistes classiques du curare est toujours partielle et fugace. Ce blocage des récepteurs s'il est puissant et prolongé, ne semble toutefois pas entraîner de lésions histologiques de la plaque, détectable au

microscope électronique, comme l'a récemment montré ZACKS et SHEFF sur des souris tuées par injection de venin de *N. haje* [48].

Ces conclusions expérimentales semblent donc rapprocher le mécanisme d'action de différents venins de Cobra à celui de venins d'Hydrophiidés dont nous avons récemment étudié les effets paralysants [11] [13]. L'isolement des fractions actives de ces venins, l'analyse de leur pureté par réactions immunologiques et l'étude de leurs actions paralysantes *a priori* voisines, permettront de préciser ces parentés fort intéressantes sur le plan biologique général.

RÉSUMÉ

1. — Nous avons étudié les effets neuromusculaires d'échantillons de venin de *N. haje* et *de N. nigricollis,* comparativement à ceux de venins de *N. naja.*

2. — Ces 3 types de venins sont des paralysants neuromusculaires, dont l'action est périphérique, lente à s'établir et pratiquement irréversible.

3. — Il apparaît également un effet contracturant sur préparations isolées et une dépression cardiovasculaire sur animaux entiers vraisemblablement dus à la fraction cardiotoxique. Ces effets sont faibles avec le *N. haje,* moyens avec le *N. naja* et très marqués avec le *N. nigricollis.*

4. — Cet effet contracturant résulte d'une action directe des fractions des venins sur la fibre musculaire. Par contre, la paralysie n'est pas due à un effet musculaire direct.

5. — Elle résulte d'un blocage lent et très difficilement réversible des récepteurs spécifiques de la membrane post-synaptique, à la manière d'une curarisation mais sans caractère compétitif.

6. — Une inhibition de la synthèse ou de la libération du transmetteur chimique de l'influx à la jonction neuromusculaire a été démontrée par certains auteurs. Nos résultats n'écartent pas la possibilité de tels effets pré-synaptiques mais rejettent leur intervention dans l'initiation de la paralysie par les différents venins de *Naja.*

SUMMARY

1. — The authors have studied the neuromuscular effects of samples of *Naja haje* and *Naja nigricollis* venoms comparatively with samples of *Naja naja* venoms.

2. — These three types of cobra venoms are neuromuscular blockers : they have a peripheral, slowly induced and irreversible action.

3. — They produced also a contracture on isolated preparations and cardiovascular depression on *in situ* preparations due to the cardiotoxic fraction. These effects are weak for *N. haje*, medium for *N. naja* and strong for *N. nigricollis* venoms.

4. — The muscle fiber was directly affected by this contracture.

5. — The paralytic effect was mainly explained by a slow and almost irreversible blockade of the specific receptors of the postsynaptic membrane. Venoms acted as curare but without competition.

6. — Without direct evidence, we assumed these venoms also possessed a presynaptic action on synthesis or release of acetylcholine.

Bibliographie

1. — Ahuja, M. L. et Singh, G. *in* Venoms, Buckley, E. E. et Porges, N. ed. A.A.A.S., Washington, 1956, p. 341.
2. — Aron, T. *Z. klin. Med.*, 1882, *5*, 481 — *ibid.*, 1883, *6*, 332.
3. — Arthus, M. *Arch. int. Physiol.*, 1910, *10*, 161 — *ibid.*, 1912, *11*, 285.
4. — Behrens, G. et Kärber, C. *Arch. exp. Pathol. Pharmakol.*, 1935, *177*, 379.
5. — Bourillet, F. et Cheymol, J. *Bull. Acad. suisse Sci. med.*, 1966, *22*, 463.
6. — Brunton, T. L. et Fayrer, J. *Proc. roy. Soc.* Ser. B, 1873, *21*, 358 — *ibid.*, 1874, *22*, 68.
7. — Brown, G. L. *J. Physiol.*, 1938, *92*, 22P.
8. — Bülbring, E. *Brit. J. Pharmacol.*, 1946, *1*, 38.
9. — Chang, C. C. et Lee, C. Y. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1963, *144*, 241.
10. — Cheymol, J. *Thérapie*, 1957, *12*, 321.
11. — Cheymol, J., Barme, M., Bourillet, F. et Roch-Arveiller, M. *Toxicon*, 1967, sous presse.
12. — Cheymol, J., Bourillet, F. et Roch-Arveiller, M. *Med. Pharmacol. exp.*, 1966, *14*, 54.
13. — Cheymol, J., Bourillet, F. et Roch-Arveiller, M. *Simp. int. Venenos animais. Mem. Inst. Butantan*, supp. commemorativo, 1966, *33*, sous presse.
14. — Cheymol, J. et Corteggiani, E. *Ann. Pharm. fr.*, 1949, *7*, 368.
15. — Cicardo, V. H. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, *120*, 732.
16. — Condrea, E., De Vries, A. et Mager, J. *Biochim. biophys. Acta*, 1964, *84*, 60.

17. — CUSHNY, A. R. et YAGI, S. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, Ser. B., 1918, *208*, 1.
18. — DALE, H. H. et GADDUM, J. H. *J. Physiol.* (London), 1930, *70*, 109.
19. — ELLIOT, R. H. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, Ser. B., 1905, *197*, 361.
20. — GARCIA DE JALÒN, P. D. *Quat. J. Pharm. Pharmacol.*, 1947, *20*, 28.
21. — GAUTRELET, J., HALPERN, N. et CORTEGGIANI, E. *Arch. int. Physiol.*, 1934, *38*, 293.
22. — GHOSH, B. N., DE, S. S. et SARKAR, N. K. *J. Ind. chem. Soc*, 1944, *21*, 93
23. — GUYOT, P. et BOQUET, P. *C. R. Acad. Sci.*, 1960, *251*, 1822.
24. — HOUSSAY, B. A. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, *105*, 308.
25. — HOUSSAY, B. A. et GUGLIELMETTI, J. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, *88*, 367.
26. — HOUSSAY, B. A. et MAZZOCCO, P. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, *93*, 1120.
27. — HOUSSAY, B. A., NEGRETE, J. et MAZZOCCO, P. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, *87*, 821.
28. — KELLAWAY, C. H. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1937, *60*, 18.
29. — LEE, C. Y. *J. Showa med. Assoc.*, 1963, *23*, 221.
30. — LEE, C. Y. et CHANG, C. C. *Simp. int. Venenos animais. Mem. Inst. Butantan*, supp. commemorativo, 1966, *33*, sous presse.
31. — LEE, S. Y., LEE, C. Y., TSENG, T. C. et CHIU, P. H. *Simp. int. Venenos Animais. Mem. Inst. Butantan*, supp. commemorativo, 1966, *33*, sous presse.
32. — LEE, C. Y. et PENG, M. T. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1961, *133*, 180.
33. — MELDRUM, B. S. *J. Physiol.* (London), 1963, *168*, 49 P.
34. — MELDRUM, B. S. *Brit. J. Pharmacol.*, 1965, *25*, 197.
35. — MELDRUM, B. S. *Pharmacol. Rev.*, 1965, *17*, 393.
36. — NARAHASHI, T. et TOBIAS, J. M. *Amer. J. Physiol.*, 1964, *207*, 1441.
37. — PURANANANDA, C. *in* Venoms, BUCKLEY, E. E. et PORGES, N. ed. A.A.A.S., Washington, 1956, p. 353.
38. — RAGOTZI, V. *Arch. Path. Anat. Physiol.*, 1890, *122*, 201.
39. — ROSENBERG, P. et PODLESKI, T. R. *J. Pharmacol. exper. Therap.*, 1962, *137*, 249.
40. — SARKAR, N. K. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, *78*, 469.
41. — SARKAR, N. K. et MAITRE, S. R. *Amer. J. Physiol.*, 1950, *163*, 209.
42. — SU, C. *J. Formosan Med. Ass.*, 1960, *59*, 1083.

43. — Thesleff, S. et Quastel, D. M. J. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 1965, *5*, 263.
44. — Vick, J. A., Ciuchta, H. P. et Polley, E. P. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1965, *153*, 424.
45. — Vital Brazil, O. Thèse Fac. Med. São Pãolo, 1963.
46. — Werler, J. E. et Keegan, H. L. *in* Venomous and poisonous animals and noxious plants of the Pacific region. Keegan, H. L. et Mac Farlane, W. V., Pergamon Press, 1963, p. 219.
47. — Wolmer, cité par Cushny, A. R. et Yagi, S. (17).
48. — Zacks, S. I. *in* The motor end-plate, Saunders, W. B. C., Philadelphia, 1964, p. 134.